

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 53—55, Januar 1969

## Isolierung von Antikörpern vom IgA-Typus

Von K. SCHUMACHER

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Köln-Lindenthal (Direktor: Prof. Dr. R. Gross)

Eingegangen am 25. September 1968)

Es wird ein Verfahren zur Isolierung von  $\gamma$ A-Globulin beschrieben, das in wenigen Trennschritten zu einem immunologisch reinen Präparat führt. Nach einer Zinksulfatfällung von vorpräzipitiertem Serum mit anschließender Ammoniumsulfatfällung wurde eine Molekularsiebung an Sephadex G-200 durchgeführt, die zur Isolierung einer 13 S- und einer 7 S-Komponente von  $\gamma$ A-Globulin führte. Immunelektrophoretisch waren beide Komponenten einheitlich. Das Verfahren wurde zur Isolierung von Antikörpern gegen partikuläre Leberzellantigene verwendet. Die Antikörperaktivität der  $\gamma$ A-Globuline wurde durch das Trennverfahren nicht beeinträchtigt.

### Isolation of IgA-type antibodies

A method for the isolation of  $\gamma$ A-globulin is described. Only a few separation steps are needed to obtain an immunologically pure preparation. After precipitation of serum with zinc sulphate and ammonium sulphate, the solubilised precipitate was separated by molecular sieving on Sephadex G-200. The eluate contained a 13 S and a 7 S component of  $\gamma$ A-globulin. In immunoelectrophoresis the two components were identical. The method was used for the isolation of antibodies against antigens from liver cells. The activity of the antibody of  $\gamma$ A-globulin type was not diminished by the separation procedure.

Während die präparative Darstellung von  $\gamma$ G-Globulinen experimentell keine Schwierigkeiten bereitet (1), stehen für die Isolierung von  $\gamma$ A- und  $\gamma$ M-Globulinen bisher einfache Verfahren nicht zur Verfügung (2, 3, 4, 5). Das von VAERMAN und Mitarbeitern (2) angegebene Verfahren zur Isolierung von  $\gamma$ A-Globulinen wurde von HEIDE und HAUPT (3) leicht modifiziert; beide Methoden enthalten aber noch eine Reihe von Trennschritten. Zur Isolierung von Antikörpern vom IgA-Typus bei Patienten mit biliärer Lebercirrhose versuchten wir durch weitere Modifikation dieser Methode ein Verfahren zu finden, das gleichzeitig einfach und schonend ist und nicht zu einer Beeinträchtigung der Antikörper-Aktivität führt.

### Methodik

#### Fällungsreaktion

Humanserum wurde zunächst, entsprechend dem Verfahren von HEIDE und HAUPT (3) 24 Stdn. gegen Wasser, pH 5,5 dialysiert. Nach Abzentrifugieren der nicht-wasserlöslichen Proteine wurde der Überstand auf einen Proteingehalt von 30 mg/ml eingestellt. Der pH-Wert wurde mit festem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 6,0 korrigiert. Anschließend wurde Zinksulfat bis zu einer Endkonzentration von 0,05M zugegeben. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 wurde nach 60 Min. der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Glycin bis zu einer Konzentration von 2% versetzt. Anschließend wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 2,0M unter ständigem Rühren zugegeben. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in Tris-HCl Puffer aufgenommen und gegen häufig gewechselten Säulenpuffer dialysiert bis zur völligen Lösung der Proteine.

#### Gelfiltration

Die weitere Fraktionierung der Proteine erfolgte durch Molekularsiebung an Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) an einer Gelpackung von 950  $\times$  28 mm. Als Säulenpuffer wurde ein 0,1M Tris-HCl Puffer, pH 8,0 + 0,1M NaCl, verwendet (6). Die Auftragsmenge betrug 360—450 mg Protein. Eluiert wurde mit 10 ml/Std.

#### Immunelektrophorese

Es wurde die Mikromethode nach SCHEIDEGGER (7) verwendet. Die Ausführung erfolgte in 1,5proz. Agar (Reinagar, Behring-

Werke, Marburg) in 0,01M Na-Barbiturat Puffer pH 8,6 mit Zusatz von Cialit 1:10000. Als Elektrodenpuffer wurde ein 0,1M Na-Barbituratpuffer pH 8,6 verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 12 mA pro Plattenrahmen (LKB-Produkte, Stockholm) und etwa 250 V durchgeführt. Die anschließende Immunpräzipitation mit Antihumanserum und monospezifischen Antisera (Behring-Werke, Marburg) erfolgte bei 4° in der Feuchtkammer innerhalb 48 Std. Danach wurden die Plättchen nativ photographiert.

Die Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (8) wurde auf Objektträgern durchgeführt. Agar und Puffer wie bei Immunelektrophorese. Diffusion und Präzipitation erfolgten bei 4°. Zur Dokumentation wurden die ungefärbten Plättchen im schräg einfallenden Durchlicht photographiert.

### Ergebnisse

Nach Dialyse des Ausgangsserums gegen Wasser trat ein feinflockiger Niederschlag auf, der die wasserunlöslichen Euglobuline enthielt. Die immunelektrophoretische Analyse des Überstandes ergab keine wesentliche Änderung gegenüber dem Ausgangsmaterial (Abb. 1a). Nach weiterer Fällung des Überstandes mit Zinksulfat war der größte Teil der Serumproteine ausgefallen, insbesondere waren das  $\gamma$ G-Globulin und die Hauptmenge des Albumins gefällt worden. In Lösung blieben das  $\gamma$ A-Globulin, daneben geringe Mengen von Transferrin, einige weitere  $\beta$ - und  $\alpha$ -Globuline und eine Spur Albumin. Dieser Überstand wurde mit Ammoniumsulfat versetzt. Das Präzipitat

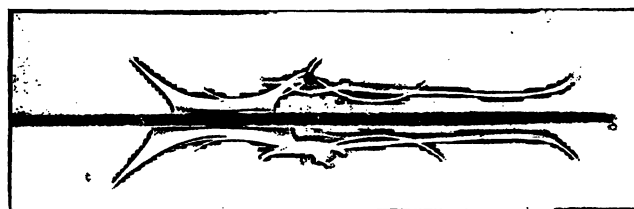


Abb. 1a

Immunelektrophoretische Analyse des Überstandes nach Euglobulinpräzipitation  
Oben: Überstand, unten: Ausgangsserum, Rinne: Antihumanserum vom Kaninchen

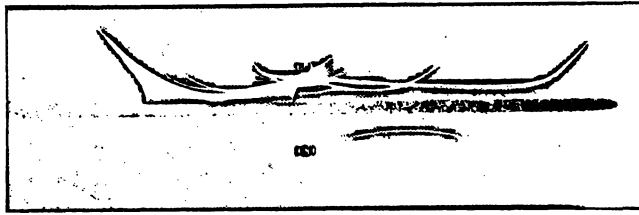


Abb. 1b

Immunelectrophorese des gelösten Präzipitates nach Ammoniumsulfatfällung (unten) im Vergleich zum Ausgangsserum (oben), entwickelt mit Antihumanserum

wurde in Säulenpuffer gelöst und immunelektrophoretisch untersucht (Abb. 1b).

Die weitere Fraktionierung dieses Proteingemisches durch Molekularsiebung an Sephadex G 200 ergab drei Fraktionen (Abb. 2), von denen die Fraktion II quantitativ stark überwog, während die Fraktion I und mehr noch die Fraktion III quantitativ sehr klein war.

Die immunelektrophoretische Analyse der Fraktionen nach Gelfiltration zeigte in Fraktion I nur eine schwache Präzipitationsbande, die der  $\gamma$ A-Globulinbande entsprach. Fraktion II enthielt reines  $\gamma$ A-Globulin, das gleichzeitig gegenüber dem Ausgangsserum stark angereichert war. In Fraktion III fanden sich Transferrin,

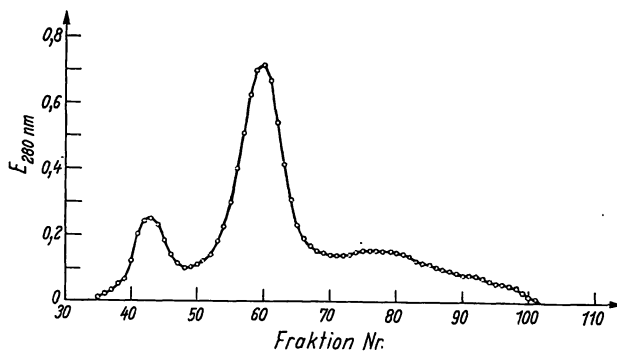


Abb. 2

Elutionsdiagramm nach Molekularsiebung des gelösten Präzipitates nach Ammoniumsulfatfällung



Abb. 3a

Immunelektrophoretische Analyse der Fraktion I nach Gelfiltration (oben) im Vergleich zum Ausgangsserum (unten)  
Fraktion I enthält reines  $\gamma$ A-Globulin in geringer Menge

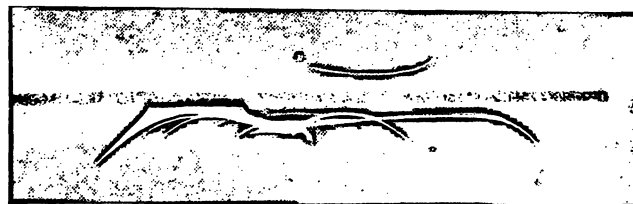


Abb. 3b

Immunelektrophorese der Fraktion II nach Gelfiltration (oben) im Vergleich zum Ausgangsserum (unten)  
Die Fraktion enthält reines  $\gamma$ A-Globulin stark angereichert

zwei Proteine mit  $\beta$ - und  $\alpha$ -Beweglichkeit und etwas Albumin (Abb. 3a, b, c).

Der Nachweis der Identität der Fraktion II mit  $\gamma$ A-Globulin wurde ferner durch Präzipitation mit monospezifischem Anti- $\gamma$ A-Globulinserum im Vergleich zum Normalserum erbracht (Abb. 3d). Eine Reaktion der Fraktion II mit monospezifischem Anti- $\gamma$ G-Globulinserum wurde dagegen nicht nachgewiesen (Abb. 3e), d. h. eine Verunreinigung des  $\gamma$ A-Globulins in Fraktion II mit  $\gamma$ G-Globulin wurde damit ausgeschlossen.

Entsprechend dem unterschiedlichen Elutionsvolumen bei der Gelfiltration wurden für die Fraktionen I und II, die immunelektrophoretisch beide  $\gamma$ A-Globulin enthielten, unterschiedliche Sedimentationskonstanten ermittelt. Für Fraktion I wurde ein  $S_{0,20}$ -Wert von 12,6, für die Fraktion II ein  $S_{0,20}$ -Wert von 7,2 gefunden.

Ausgangsmaterial der Isolierung von  $\gamma$ A-Globulinen waren Seren von Patienten mit biliärer Lebercirrhose, bei denen mit dem Antiglobulinkonsumptionstest und der Doppeldiffusionstechnik Antikörper gegen partikuläre Antigene aus Humanlebercytoplasma nachgewiesen worden waren. Nachdem die Prüfung der  $\gamma$ G- und  $\gamma$ M-Globulinfraktionen dieser Seren keine Reaktion mit den betreffenden Antigenen ergeben hatte,



Abb. 3c

Immunelektrophorese der Fraktion III nach Gelfiltration (oben) im Vergleich zum Ausgangsserum (unten)  
Die Fraktion enthält Transferrin, zwei Proteine mit  $\beta$ - und  $\alpha$ -Beweglichkeit und eine Spur Albumin



Abb. 3d

Immunelektrophorese der Fraktion II nach Gelfiltration (oben) im Vergleich zum Ausgangsserum (unten), entwickelt mit Anti- $\gamma$ A-Globulinserum  
Die Präzipitationsbande entspricht der Bande in Abb. 3b oben. Fraktion II ist demnach identisch mit  $\gamma$ A-Globulin

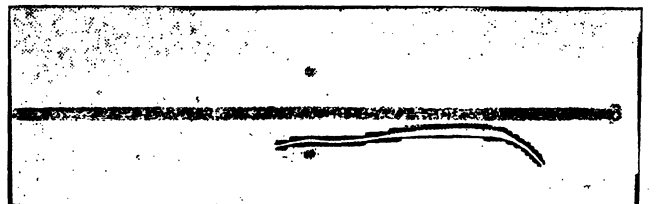


Abb. 3e

Immunelektrophorese der Fraktion II nach Gelfiltration (oben) im Vergleich zum Ausgangsserum (unten), entwickelt mit Anti- $\gamma$ G-Globulinserum. Fraktion II ist frei von  $\gamma$ G-Globulin

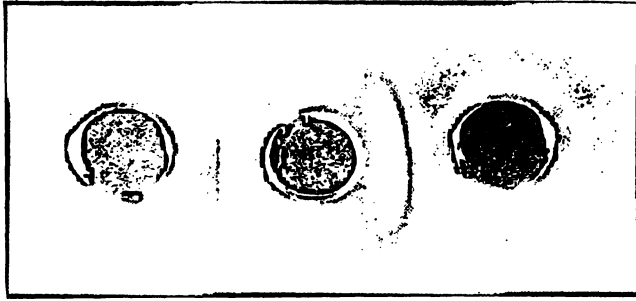


Abb. 4

Doppeldiffusionsansatz: Mitte: Humanleber-Mitochondrien, links: Ausgangsserum, rechts: Fraktion II nach Gelfiltration  
Deutliche Reaktion des Ausgangsserums, sehr starke Reaktion des isolierten  $\gamma$ A-Globulins mit Leber-Mitochondrien

wurden die nach der hier beschriebenen Methode durch Gelfiltration gewonnenen Fraktionen auf ihre Antikörperaktivität geprüft. Dabei ergab sich eine Reaktion der Fraktion II mit partikulären Leberzellantigenen (Mitochondrien) (Abb. 4), während Fraktion I und III inaktiv waren. Die Antikörperaktivität, die hier in der Fraktion der  $\gamma$ A-Globuline lokalisiert war, hatte durch das Trennverfahren keine Einbuße erfahren.

#### Diskussion

Durch die kombinierte Anwendung von Zinksulfat- und Ammoniumsulfatfällung mit Gelfiltration ist eine Isolierung von IgA-Antikörpern aus Humanserum möglich. Diese Methode stellt eine vereinfachte Modifikation eines von VAERMAN und Mitarbeitern (2) sowie HEIDE und HAUPT (3) angegebenen Verfahrens dar. Auf die Zonenelektrophorese kann dabei ver-

zichtet werden. Durch immunoelektrophoretische Analyse der Fraktionen konnte der Nachweis der Identität und Reinheit der  $\gamma$ A-Globulin-Präparation erbracht werden. Eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität von Antikörpern, die nach diesem Verfahren isoliert wurden, trat nicht ein, wie am Beispiel von Antikörpern gegen partikuläre Leberzellantigene gezeigt werden konnte.

Mit Hilfe dieser Methode wurde ein  $\gamma$ A-Globulin mit der Sedimentationskonstante 7 S isoliert. Gleichzeitig fand sich in geringer Menge noch ein  $\gamma$ A-Globulin mit der Sedimentationskonstante 12,6 S, das in der ersten Fraktion nach Gelfiltration ebenfalls rein eluiert wurde. Ob es sich bei dieser schweren Form des  $\gamma$ A-Globulins um ein durch das Trennverfahren induziertes Aggregationsprodukt (8, 9), oder um die schwere Komponente des  $\gamma$ A-Globulins (10) handelt, kann nicht entschieden werden. Eine Antikörperaktivität dieser schweren Komponente war nicht nachweisbar. Allerdings stand diese 13 S-Fraktion nur in extrem kleiner Menge zur Verfügung. Eine ebenfalls von HEREMANS (10) beschriebene 10,5 S-Komponente des  $\gamma$ A-Globulins wurde nicht isoliert.

Zur Isolierung von  $\gamma$ A-Globulin ist eine Kombination mehrerer Trennverfahren nicht zu umgehen. Die hier beschriebene Kombination von Fällungsreaktion und Gelfiltration führt in wenigen Trennschritten zu einem immunologisch reinen Präparat. Diese Methode ist zur Isolierung von Antikörpern geeignet, denn eine Denaturierung der Proteine tritt bei exakter Durchführung nicht ein.

#### Literatur

1. SOBER, H. A. und E. A. PETERSON, Federation Proc. 17, 1116 (1958). — 2. VAERMAN, J. P., J. F. HEREMANS und C. VAERMAN, J. Immunol., Baltimore 91, 7 (1963). — 3. HEIDE, K. und H. HAUPT, Behring-Werk Mitt. 43, 161 (1964). — 4. SCHUMACHER, K., diese Z. 4, 196 (1966). — 5. SCHUMACHER, K., Klin. Wschr. 45, 1045 (1967). — 6. FLODIN, P. und J. KILLANDER, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 63, 403 (1962). — 7. SCHEIDEGGER,

J. J., Internat. Arch. Allergy 7, 103 (1955). — 8. OUCHTERLONY, O., In: P. Kallos, Progress in Allergy. Basel and New York; S. Karger (1958). — 9. HEIDE, K., Bibl. Haemat. 12, 245 (1961). — 10. ISLIKER, H. und E. F. LÜSCHER, Helv. med. Acta 26, 152 (1959). — 11. HEREMANS, J. F., Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 17, 119 (1961).

Priv.-Doz. Dr. K. Schumacher  
5000 Köln-Lindenthal  
Josef-Stelzmann-Straße 9